



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-045616

(43)Date of publication of application : 17.02.1998

(51)Int.Cl.

A61K 38/00

A61K 9/08

A61K 38/43

A61K 38/48

A61K 38/21

A61K 47/42

(21)Application number : 08-204576

(71)Applicant : SHIONOGI & CO LTD

(22)Date of filing : 02.08.1996

(72)Inventor : OSADA TOSHIHARU
TAKESHIMA KAZUO
KOBAYASHI HIRONAO

(54) SUSTAINED RELEASE PREPARATION FOR INJECTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject preparation capable of not coagulating at a room temperature, forming a fibrin clot after subcutaneous administration and gradually releasing a medicine by adjusting the blending ratio of a fibrinogen and a thrombin to a proper value.

SOLUTION: This preparation comprises (A) a medicinal active ingredient, (B) a fibrinogen, (C) a blood coagulation 13 factor and (D) a thrombin in the blending ratio of the component D to the component B equivalent to 1-30 units, preferably 1.2-6 units of the component D to 80mg of the component B. The preparation further contains (E) calcium ion and the component A is a protein medicine, especially interleukin 2 or interferon- γ . The preparation further contains (F) hyaluronic acid. Preferably, a kit for making the objective preparation when necessary is composed of a basic constitution of a lyophilized product containing the component B and the component C and a lyophilized product containing the component D (the component A is contained in either of the lyophilized products).

4

1095448

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-45616

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月17日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|--------|---------------|--------|
| A 6 1 K 38/00 | A B U | | A 6 1 K 37/02 | A B U |
| 9/08 | | | 9/08 | F |
| 38/43 | | | 47/42 | Z |
| 38/48 | | | 37/465 | |
| 38/21 | | | 37/547 | |

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|-----------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平8-204576 | (71) 出願人 | 000001926 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 |
| (22) 出願日 | 平成8年(1996) 8月2日 | (72) 発明者 | 長田 俊治 兵庫県芦屋市浜風町6-11-4 |
| | | (72) 発明者 | 竹島 和男 大阪府大阪市鶴見区鶴見3-13-32-1509 |
| | | (72) 発明者 | 小林 裕直 京都府京都市伏見区桃山町日向官有無番地 府営住宅4-409 |
| | | (74) 代理人 | 弁理士 高山 裕貢 |

(54) 【発明の名称】 注射用徐放性製剤

(57) 【要約】

【課題】 注射用の徐放性製剤であって、投与までは凝固しにくく水溶液として投与可能であるが、投与後は体内で速やかにゲル化または固体状態になりフィブリンクロットを形成し、内包薬物を徐放化せしめる製剤を提供する。

【解決手段】 医薬活性成分、フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、及びトロンビンを含む注射用徐放性製剤であって、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率が、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率であることを特徴とする製剤及びその用時調製用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 医薬活性成分、フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、及びトロンビンを含む注射用徐放性製剤であって、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率が、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率であることを特徴とする製剤。

【請求項2】 フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率が、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1.2～6単位に相当する比率である、請求項1記載の製剤。

【請求項3】 更にカルシウムイオンを含有する、請求項1記載の製剤。

【請求項4】 医薬活性成分がタンパク性医薬品である、請求項1記載の製剤。

【請求項5】 医薬活性成分がインターロイキン-2またはインターフェロン-γである、請求項4記載の製剤。

【請求項6】 更にヒアルロン酸を含有する、請求項1記載の製剤。

【請求項7】 皮下注射用である、請求項1記載の製剤。

【請求項8】 基本的構成として以下を含む、請求項1記載の製剤を用時調製するためのキット：

A：フィブリノーゲン及び血液凝固第13因子を含む凍結乾燥品、及び

B：トロンビンを含む凍結乾燥品

（上記AまたはBの凍結乾燥品のいずれかに医薬活性成分が含まれており、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率である）。

【請求項9】 A又はBの凍結乾燥品とは別に、カルシウムイオンを含有する調製液を含む、請求項8記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、種々の医薬活性成分の薬効持続化に有用な注射用徐放性製剤及びその用時調製用キットに関する。更に詳しくは、医薬活性成分、フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、及びトロンビンを含む注射用徐放性製剤であり、特にタンパク性医薬品を皮下又は筋肉内投与するのに好適である。

【0002】

【従来技術】医薬活性成分の薬効持続化を目的とする製剤として、既にフィブリノーゲンの凝固によるフィブリン塊（以下、フィブリンクロット又は単にクロットという）形成の機構を利用した製剤がいくつか報告されている。

文献（BIOTHERAPY, 5(6), 1086-1090, 1991, 高橋ら）

には、IL-2・Fibrin製剤の徐放効果及びマウスColon26皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果が報告されている。具体的には、in vitro試験として、A液（IL-2、フィブリノーゲン、血液凝固第13因子を含むアブロチニン溶液）とB液（トロンビンを含む塩化カルシウム溶液）を当量混合して作成したIL-2・Fibrin製剤を固層化して徐放性を検討しているが、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲン80mgに対してトロンビンが250単位である。更に、in vivo試験としてマウスへの皮下投与を行っているが、該A液及びB液を2本の注射器で別々に注射している。

【0003】特開平6-336444号には、フィブリノーゲン及び／又はフィブリンを含有する徐放性医薬品組成物が開示されているが、適用薬物は脂溶性薬物に限定されており、また添加剤としてアニオン性界面活性剤を必須とする。更に、フィブリンを調製する際のフィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲン80mgに対してトロンビンが30～500単位と記載されている。特開平7-41432号には、薬物を封入したリポソーム又はリビッドマイクロスフェアがフィブリノーゲン又はフィブリン中に均一に分散される徐放性医薬品組成物が開示されているが、フィブリンを調製する際のフィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲン20mgに対してトロンビンが30～500単位と記載されている。

【0004】又、市販の生物学的組織接着剤もフィブリノーゲンとトロンビンによるフィブリン生成過程を応用したものであり、例えばティシール（イムノ社）の添付文書には、製剤成分として、フィブリノーゲンとトロンビンの配合比率が、フィブリノーゲン90mgに対してトロンビンが500単位または4単位のものが開示されている。しかし、このような生物学的組織接着剤は、生体組織の接着、閉鎖を可能とするものであり、手術等の際に縫合、接合が困難な場合や血液、体液等の漏出をきたす場合に用いられており、薬物の徐放化を目的としたものではない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】フィブリンクロット形成機構を利用した従来の徐放化製剤では、フィブリノーゲンに対するトロンビンの配合比率が相対的に高く、典型的には、例えばフィブリノーゲン80mgに対してトロンビンが約250単位程度の割合で試験されている。そして、トロンビン添加量の下限としては、通常、フィブリノーゲン80mgに対してトロンビンが少なくとも30単位以上である。その結果、トロンビンと混合されたフィブリンは体外において比較的短時間でフィブリンクロットを形成して凝固し、投与不可能となる恐れがある。そのため、注射剤として投与する場合には、薬物、フィブリノーゲン及びトロンビンを含有する混合液を調製した後、注射器へ速やかにセットしかつ瞬時に投与す

3

るか、もしくはフィブリノーゲンを含有する溶液とトロンビン含有する溶液とを別々に注射する必要がある。又、該両液を2液混合型の注射器にセットしたとしても、混合後にはやはり速やかに投与しなければならない。このような現状は、臨床上の投与操作としては満足のいくものではなく、医師のみならず患者にとっても精神的抑圧に繋がるものである。

【0006】よって、特別な技法を要することなく容易に注射可能な徐放性製剤の開発が要望されていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題に鑑み鋭意検討した結果、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率を適正に調整すれば、使用時に特段の技法を要しない注射用徐放性製剤が得られることを見出し本発明を完成した。即ち、本発明は、医薬活性成分、フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、及びトロンビンを含む注射用徐放性製剤であって、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率が、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率であることを特徴とする製剤（以下、本発明製剤という）を提供する。本発明製剤は、注射液として混合調製された後、室温下ではすぐに凝固することなくかつ皮下投与後には、薬物が放出される前にフィブリンクロットを形成して薬物をクロット内に取込み、その後、徐々に薬物を放出することが可能な注射用の組成物である。

【0008】本発明製剤の好ましい形態としては、

- a. フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率が、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1.2～6単位に相当する比率である製剤；
- b. 更にカルシウムイオンを含有する製剤；
- c. 医薬活性成分がタンパク性医薬品である製剤；
- d. 医薬活性成分がインターロイキン-2またはインターフェロン-γである製剤；
- e. 更にトロンビン抑制剤を含有する製剤；
- f. トロンビン抑制剤がメシル酸ガベキサートである製剤；
- g. 更にヒアルロン酸を含有する製剤；
- h. 皮下注射用である製剤；等が例示される。

【0009】更に、本発明は本発明製剤を用時調製するためのキット（以下、本発明キットという）も提供する。該キットの基本的構成は以下のA及びBからなる。A：フィブリノーゲン及び血液凝固第13因子を含む凍結乾燥品。

B：トロンビンを含む凍結乾燥品。

上記AまたはBの凍結乾燥品には医薬活性成分が含まれており、フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率である。本発明キットの好ましい形態としては、

4

- a. A及びBの凍結乾燥品とは別に、カルシウムイオンを含有する調製液を含むキット；
- b. A又はBのいずれかの凍結乾燥品中に更にトロンビン抑制剤を含有するキット等が例示される。

【0010】以下、本発明製剤及びキットについて更に詳しく説明する。本発明に適用可能な医薬活性成分としては、注射により皮下または筋肉内に投与されてその近傍で局所的にまたは血中に移行して全身的に作用し、その治療用途によって薬効の持続化が望まれる薬物が幅広く適用され得る。具体的には骨関連ペプチドとしてカルシトニン、エルシトニン、骨形成因子（BMP）、副甲状腺ホルモン等、ナトリウム利尿ペプチドとして心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、ANP分解酵素阻害剤、B型ナトリウム利尿ペプチド、C型ナトリウム利尿ペプチド等、エンドセリン関連物質としてエンドセリン受容体拮抗剤、エンドセリン変換酵素等、血小板増殖因子としてトロンボポエチン（TPO）等、リンフォカイン類として腫瘍壊死因子（TNF）、各種インターロイキン（IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15等）、各種インターフェロン（IFN-α, β, γ）、コロニー刺激因子（CSF）、マクロファージ活性化因子（MAF）等、各種成長因子類として神経成長・栄養因子、上皮細胞成長因子（EGF）、繊維芽細胞成長因子（FGF）、インスリン様成長因子I（IGFI）、血管形成因子、血小板由来成長因子（PDGF）、血液幹細胞成長因子（SCF）、肝細胞成長因子（HGF）、トランスフォーミング成長因子等、消化管ホルモンとしてガストリン、グルカゴン、セクレチン、ボンベシン、モチリン、コレシストキニン等、癌関連物質としてメチオネース、ネオカルチノスタチン等、その他としてインスリンおよびその誘導体、エリスロポエチン（EPO）、ヒト成長ホルモン、アンチセンス医薬品、ワクチン、免疫抑制剤等が例示される。その中でも好ましくはインターロイキンやインターフェロン等のタンパク性医薬品である。該医薬活性成分の配合量は、その種類、対象疾患、患者の状態、投与回数等を考慮の上、適宜設定すればよい。

【0011】フィブリノーゲンに対するトロンビンの配合比率は、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率である。該比率はより好ましくは、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く6単位以下、更に好ましくは、1.2～6単位、最も好ましくは例えば、2～4単位である。本発明製剤は生体内に投与されると、活性化されたトロンビンがフィブリノーゲンに作用してフィブリンモノマー、次いでフィブリンポリマーが生成し、それがカルシウムイオン存在下、血液凝固第13因子により架橋（cross linking）されて最終的に医薬活性成分を一部又は全部取込んだ形でフィブリンクロットが形成される。その後、薬物がクロット

内から徐放出されることにより、薬効の持続化が達成される。

【0012】しかし、本発明製剤においてトロンビンの配合比率がフィブリノーゲンが80mgに対して30単位以上であると、水溶液に調製後、室温附近（約20℃前後）において非常に短時間、例えば、約18秒程度で凝固してしまう。よって、該水溶液を注射器にセットして生体内に投与するのに十分な時間が確保されず、慎重な薬物投与が出来ないばかりか、場合によっては投与前に注射器内で凝固してしまい投与不可能な事態に陥る。一方、トロンビンの配合比率がフィブリノーゲン80mgに対して1単位以下であると、例えば37℃におけるフィブリンクロット形成時間が約13分以上もかかり、生体内に投与された後の凝固が著しく遅れる。その結果、内包薬物の大部分が、クロットが形成される前に投与部位から急激に拡散、放出されてしまうので、薬効の持続化を達成するのが困難となる。このように、トロンビンの配合比率がいずれの限定範囲を超えても、注射用の徐放化製剤としては実用性が著しく低下するか使用不可能である。

【0013】血液凝固第13因子の配合比率は、通常、フィブリノーゲンが80mgに対して血液凝固第13因子が約0.05~100単位、好ましくは約0.1~80単位、更に好ましくは約0.25~60単位である。血液凝固第13因子の配合比率が多い分には特に支障はないと考えられるが、少なすぎるとフィブリンクロットが軟らかくなり、薬物の徐放出性に悪影響を及ぼすので好ましくない。本発明製剤においては、任意にカルシウムイオンが含有され得る。本発明製剤が生体内に投与された後、フィブリンクロットが形成されるためには、カルシウムイオンの存在が必須であるが、該カルシウムイオンは生体内にも存在するのであらかじめ製剤成分として含有しておかない場合でも、フィブリンクロットは形成され得る。しかし、薬物の種類に応じて徐放化パターンをよりハイレベルでコントロールする製剤設計の観点からは、あらかじめ製剤成分としてカルシウムイオンを含有しておく方が好ましい。その場合、カルシウムイオンの配合比率は、通常、フィブリノーゲン80mgに対して約5~200mmol、好ましくは約10~100mmol、より好ましくは約30~70mmolに相当する比率である。該カルシウムイオンは、例えば塩化カルシウム等のカルシウム塩として配合され得る。

【0014】本発明製剤は更に、製剤の安定化剤、pH調節剤、等張化剤、保存剤、薬物徐放化の調節剤等の添加剤を任意に含有し得る。安定化剤としては、例えば、人血清アルブミン、アプロチニン、L-アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム、 α -トコフェロール等が例示される。pH調節剤としては、例えば、塩酸、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、各種アミノ酸塩等が例示される。等張化剤としては、例えば、食塩、ブドウ糖、マン

ニトール等が例示される。保存剤としては、例えば、ベンジルアルコール、安息香酸またはそのエステル類、塩化ベンザルコニウム等が例示される。

【0015】徐放化の調節剤としては、例えば、グアニジン安息香酸誘導体（例：メシル酸ガベキサート、メシル酸カモスタット、メシル酸ナファモスタット、メシル酸パタモスタット等）、アルガトロバン、ヒルジン等、トロンビンの作用を抑制し得る物質（以下、トロンビン抑制剤という）や、ヒアルロン酸、リン脂質、乳酸/グルコール酸系のポリマーの微粒子（マイクロスフェア）等が例示される。上記の添加剤の種類、配合量は、その添加目的、医薬活性成分の種類・量、併用する他の添加剤の種類等を考慮して適宜設定すればよい。

【0016】次に、本発明製剤の調製法について説明する。本発明製剤は、上記の各成分、任意の添加剤を含有する限りにおいて、粉末混合物、または注射可能な程度の粘性である水性溶液のいずれの形態であってもよい。各種成分、添加剤の配合方法・順序は、配合された混合物が水存在下において注射でき得る限りにおいて特に限定されないが、より好ましい調製方法としては、本発明キットを使用する方法が例示される。以下、本発明キット及びその使用方法について説明する。

【0017】本発明キットは、前記の通り基本的構成として、

A：フィブリノーゲン及び血液凝固第13因子を含む凍結乾燥品、及び

B：トロンビンを含む凍結乾燥品、を含有し、AまたはBの凍結乾燥品には更に医薬活性成分が含まれている。フィブリノーゲンとトロンビンとの配合比率は、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く30単位より少ない量に相当する比率である。該比率はより好ましくは、フィブリノーゲンが80mgに対してトロンビンが1単位より多く6単位以下、更に好ましくは、1.2~6単位、最も好ましくは例えば、2~4単位である。

【0018】血液凝固第13因子の配合比率は、通常、フィブリノーゲンが80mgに対して血液凝固第13因子が約0.05~100単位、好ましくは約0.1~80単位、更に好ましくは約0.25~60単位である。本発明キットは、更に前記の添加剤や1以上の注射剤調製液を任意に含有し得る。更に該調製液は、塩化カルシウム等のカルシウム塩を任意に含有し得る。その場合、カルシウム塩の配合比率は、通常、フィブリノーゲン80mgに対して約5~200mmol、好ましくは約10~100mmol、より好ましくは約30~70mmolに相当する比率である。

【0019】A及びBそれぞれの凍結乾燥方法は、含有成分の品質に悪影響を及ぼさない限りにおいて特に制限されるものではなく、周知の凍結乾燥方法を適用し得る。上記A及びBの凍結乾燥品を水存在または非存在下

に混合することにより本発明製剤が調製される。該混合はA及びBの凍結乾燥品を注射器内にセットする前、あるいは両者を非接触状態で注射器内にセットした後のいずれでもよい。後者の場合の注射器としては、例えば、WO94/12227号、WO95/17916等に記載のキット式注射器が使用可能である。本発明製剤は、室温下で水性溶液状態で存在する時にすぐには凝固しないので、従来の注射用徐放性製剤と比較して、投与するまでに比較的時間的余裕がある。しかし、本発明製剤を注射器内又は外で水溶液状態で調製してから生体内に投与するまでの時間としては、好ましくは約1.5分以内、より好ましくは約1分以内が推奨される。また投与するまで該水溶液を約20℃以下、好ましくは約4℃以下に保つことが望ましい。

【0020】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すがこれらは本発明をなんら制限するものではない。尚、rIL-2にはイムネース（シオノギ）、IFN-γにはイムノマックス*

【表1】

| トロンビンの添加量 | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (単位) | 0.5 | 1 | 1.2 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 30 | 300 | |
| クロットの | 室温 | 23.5 | 16.7 | 10.0 | 4.4 | 2.0 | 1.8 | 1.3 | 1.5 | 0.3 | 0.3 |
| 形成時間(分) | 37℃ | 15.7 | 13.0 | 5.5 | 4.8 | 2.0 | 1.8 | 1.7 | 1.0 | 0.2 | 0.2 |

クロットの形成時間はトロンビン添加量の影響を受け、添加量が多いほど室温、37℃とも形成時間が短くなった。しかし、トロンビン量を30単位未満に設定することにより、室温でのクロット形成時間を遅延させることができ、特に6単位以下に設定することにより、1分以上に制御可能であった。又、トロンビンの量を1単位より多く設定することにより、体温を想定した37℃でのクロット形成時間を13分未満に、1.2単位以上にすることにより5.5分以内に制御できた。

【0022】**実施例2**：トロンビン添加量と内包薬物放出との関係
分子量約1万の蛍光標識デキストラン（FITC-DEX）をクロットに内包させ、FITC-DEXの放出性に及ぼすトロンビ※

【表2】

| トロンビンの量 (単位) | 0.4 | 1.7 | 6.8 | 27.3 |
|--------------|-----|-----|-----|------|
| 5分後の放出率 (%) | 100 | 10 | 10 | 10 |

トロンビンの添加量が0.4単位の時には、5分後までの薬物放出率は100%に達し、全く凝固しなかった。一方、1.7単位以上では、同放出率は10%にとどまり、速やかにクロットが形成されることが分かった。

【0024】**実施例3**：in vivoにおけるクロットからのrIL-2の放出
rIL-2（イムネース、シオノギ）を内包する本発明製剤をマウスの皮下に投与し、形成されたクロット中に残存するrIL-2量と血漿中濃度の時間推移を求めた。

*（シオノギ）を使用した。

実施例1：トロンビン添加量とクロット形成時間との関係

フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、トロンビンおよびカルシウムイオンを基本組成とする本発明製剤で、トロンビンの添加量を変えた時のクロットの形成時間を測定した。

（クロットの形成時間の測定方法）

(1) フィブリノーゲン80 mgと血液凝固第13因子60単位を緩衝液(pH7.5)1 mlで溶解し、氷冷した。

(2) トロンビンを塩化カルシウム溶液(5.88 mg/ml)で溶解し、氷冷した。

(3) 上記の(1)と(2)のそれぞれ0.1 mlを室温（約20℃）または37℃に調整した容器にとり、軽く混合後、容器を転倒させた時に流動性が消失した時間をクロット形成時間とした。37℃におけるクロット形成時間は、容器を37℃に調節した水槽中に保温して測定した。

【0021】（結果）結果を表1に示す。

※の影響を調べた。

（試験方法）

(1) フィブリノーゲン80 mgと血液凝固第13因子60単位およびFITC-DEX（4 mgを燐酸緩衝生理食塩液1 mlに溶解）を緩衝液(pH7.5)1 mlで溶解した。

(2) トロンビンを塩化カルシウム溶液(5.88 mg/ml)1 mlで溶解した。

(3) 上記(1)と(2)それぞれの液を0.1 mlずつポリプロピレン製遠心管（10 ml）に取り、37℃で5分経過後、37℃に保温した燐酸緩衝生理食塩液 8 mlを加えた。37℃に保存し、5分後の溶液中のFITC-DEX濃度を蛍光光度計（励起波長494 nm、蛍光波長517 nm）で定量した。

【0023】（結果）結果を以下の表2に示す。

（試験方法）

(1) フィブリノーゲン24 mg、血液凝固第13因子18単位、トロンビン 0.9 単位、塩化カルシウム1.76 mg、及びrIL-2を10166 JRU内包する水溶液約0.6 mlを調製した後、注射器にセットして、C3H/HeNマウスの背部皮下に投与した。

(2) 一定時間経過後、エーテル麻酔下大静脈から採血し、さらにクロットを回収した。

(3) クロットはホモゲナイザーで十分破砕し遠心後の上

清を検体として、また血液は血漿を分離し、それぞれに含まれるrIL-2濃度をELISA (Amersham製定量キット) で定量した。

【0025】(結果) 投与後のクロット中のrIL-2の残存量の時間変化を図1に、血漿中rIL-2濃度を図2に示す。クロット中にrIL-2は長期間残存し、1週間後でも約0.2%残った。また対照の水溶液に比して、本発明製剤では投与直後の血漿中濃度の急激な立ち上がりがなく血漿中濃度は持続し、更にパイオアペイラビリティー (AUC: 血漿中濃度-時間曲線下面積) は増大し、吸収率は向上した。

【0026】実施例4: ヒアルロン酸を添加した場合のrIL-2のin vivo放出

フィブリノーゲン、血液凝固第13因子、トロンビン、塩化カルシウム、rIL-2の各含量は同一の2種類の本発明製剤 (メシル酸ガベキサート量が異なる) について、ヒアルロン酸ナトリウムのrIL-2の放出性に及ぼす影響をマウスで調べた。

(試験方法)

(1) フィブリノーゲン24 mg、血液凝固第13因子18単位、トロンビン 0.9 単位、塩化カルシウム1.76 mg、及びrIL-2を28000 JRU内包し、メシル酸ガベキサートを含まない本発明製剤 I 及びメシル酸ガベキサートを1.2 mg含有する本発明製剤 II を調製した。

(2) 上記各製剤またはこれらにヒアルロン酸ナトリウムを2 mgを含有する製剤 (約0.6 ml) をC3H/HeNマウスの背部皮下に投与した。

(3) 投与後2及び4時間後に大静脈から採血し、血漿中のrIL-2濃度をELISA (Amersham製定量キット) で定量した。

【0027】(結果) 結果を表3に示す。

【表3】

| 組成 | | 血漿中濃度(JRU/ml) | |
|----|--------|---------------|-----|
| 製剤 | ヒアルロン酸 | 2時間 | 4時間 |
| I | 無 | 151 | 117 |
| | 有 | 148 | 171 |
| II | 無 | 212 | 110 |
| | 有 | 106 | 168 |

ヒアルロン酸を添加することにより、いずれの製剤でも2時間目の血漿中濃度は低くなり、4時間目は逆に高くなった。これは、クロットからのrIL-2の放出がヒアルロン酸の添加で遅延したことを意味している。

【0028】実施例5: in vivoにおけるクロットからのIFN- γ の放出

リコンビナントインターフェロナーガンマー (IFN- γ) を10万JRU含有する本発明製剤をマウスの背部皮下に投与し、クロット中の経時的な残存量および血漿中濃度の推移を投与後24時間まで測定した。

(試験方法)

(1) 実施例3と同一組成の本発明製剤にIFN- γ を内包さ

せ、C3H/HeNマウスの背部皮下に0.6 ml投与した。IFN- γ の投与量は10万JRUに調節した。

(2) 一定時間経過後に、エーテル麻酔下大静脈から採血し、さらにクロットを回収した。

(3) クロットは細断後プラスミンで破壊した。遠心後の上清および血漿中のIFN- γ 濃度をELISA (Bio Source製定量キット) で定量した。

【0029】(結果) 投与後のクロット中のIFN- γ の残存量の時間変化を図3に、血漿中IFN- γ 濃度を図4に示す。IFN- γ は、24時間後でも約30%がクロット内に残存した。また、血漿中濃度は4時間以降ほぼプラトーな状態を保った。

【0030】実施例6: rIL-2内包製剤の抗腫瘍作用
rIL-2を内包する本発明製剤を骨髓腫細胞を移植したマウスの背部皮下に投与し、1週間後の腫瘍重量を測定して、抗腫瘍作用を評価した。

(試験方法)

(1) マウス骨髓腫細胞X5563をC3H/HeNマウスの腹腔内で継代培養し、 2×10^5 個の同細胞を同系のマウスの背部皮下に移植した。

(2) フィブリノーゲン24 mg、血液凝固第13因子18単位、トロンビン 0.9 単位、塩化カルシウム1.76 mg、及び種々の濃度のrIL-2を含む本発明製剤 (約0.6 ml) を上記マウス (移植後1週間経過) の背部皮下に投与した。

(3) 製剤を投与1週間後に、エーテル麻酔下大静脈から採血し、さらに腫瘍塊を回収した。

(4) 血液はヘパリンを添加して遠心し血漿を分離し、rIL-2濃度をELISA (Amersham製定量キット) で定量した。

(5) 腫瘍塊は重量を測定した。腫瘍作用は、生理食塩液を投与したコントロールの腫瘍重量との比率で表し、投与日を1とするT/C値で表示した。

【0031】(結果) 結果を図5に示す。対照とする水溶液の単回投与では投与量を増しても、T/C値は最小約0.7であったが、本発明製剤では0.5以下まで低下し腫瘍作用の増強が認められた。

【0032】実施例7: ヒト固形腫瘍に対するrIL-2内包製剤の抗腫瘍作用

ヒト肝細胞癌細胞 (HuH-7) をヌードマウスの背部皮下に移植した系で、rIL-2を内包する本発明製剤の抗腫瘍作用を評価した。

(試験方法)

(1) ヒト肝細胞癌細胞 (HuH-7) をヌードマウスの背部皮下で継代培養し、その100mgを背部皮下に移植後7日目に、実施例3と同一組成 (rIL-2の含量は適宜変更した) の本発明製剤を腫瘍周囲に10日間連続投与 (移植7日目から16日目まで) した。対照としては、rIL-2の水溶液を使用した。いずれも1群5匹のマウスを用いた。

(2) 経時的に、腫瘍の大きさを計測した。

【0033】(結果) 本発明製剤を投与した場合のT/C変化を図6に、対照としてrIL-2の水溶液を投与した

11

場合のT/C変化を図7に示す。本発明製剤では、rIL-2の水溶液の場合よりも低投与量で優れた抗腫瘍作用を示した。

【0034】実施例8

以下の組合わせから構成されるrIL-2を含む本発明キットを作成する。

A：フィブリノーゲン80mg、血液凝固第13因子60単位、ヒト血清アルブミン19mg、及びrIL-2を約1万〜36万JRU含有する凍結乾燥バイアル。

B：トロンビンを3単位含有する凍結乾燥バイアル。

C：塩化カルシウム水溶液1ml（塩化カルシウムとして5.9mg含有）

実施例9

以下の組合わせから構成されるIFN- γ を含む本発明キットを作成する。

A：フィブリノーゲン80mg、血液凝固第13因子60単位、ヒト血清アルブミン19mg、及びIFN- γ を約100万〜300万JRU含有する凍結乾燥バイアル。

B：トロンビンを3単位含有する凍結乾燥バイアル。

C：塩化カルシウム水溶液1ml（塩化カルシウムとして5.9mg含有）

【0035】

【発明の効果】本発明製剤は、投与までは凝固しにくく水溶液として投与可能であるが、注射後体内に入ると即座にゲル化または固体状態になり、フィブリンクロットを形成する。フィブリンクロット中に内包された医薬品は、これらの分解に伴って体内で徐々に放出される。徐放出は頻回投与を削減でき、又組織中で薬物濃度を一定の水準に維持することも可能であるので、医薬品の薬効作用が増強される。また、急激な組織中濃度の上昇を抑制することにより副作用の低減が図られる。

【0036】

【図面の簡単な説明】

【図1】 rIL-2を含む本発明製剤をマウスの皮下に投与した場合のクロット中のrIL-2の残存量の経時変化を示すグラフである。縦軸はクロット中の残存率（%）、横軸は時間（hr）を表す。

12

【図2】 rIL-2を含む本発明製剤（クロット製剤）及び対照製剤（水溶液）をマウスの皮下に投与した場合の血漿中のrIL-2濃度の経時変化を示すグラフである。縦軸は血漿中濃度（JRU/ml）、横軸は時間（hr）を表す。

【図3】 IFN- γ を含む本発明製剤をマウスの皮下に投与した場合のクロット中のIFN- γ の残存量の経時変化を示すグラフである。縦軸はクロット中の残存率（%）、横軸は時間（hr）を表す。

10 【0037】

【図4】 IFN- γ を含む本発明製剤をマウスの皮下に投与した場合の血漿中のIFN- γ 濃度の経時変化を示すグラフである。縦軸は血漿中濃度（JRU/ml）、横軸は時間（hr）を表す。

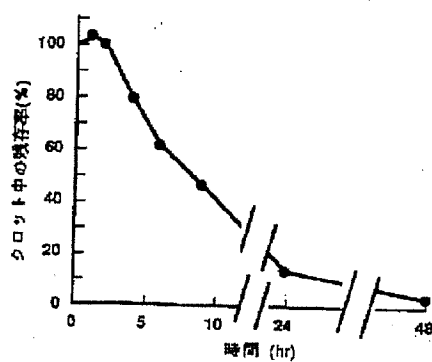
【図5】 rIL-2を含む本発明製剤（クロット製剤）及び対照製剤（水溶液）を、骨髓腫細胞を移植したマウスの皮下に投与した場合の1週間後の腫瘍重量について、投与量別に調べた結果を示すグラフである。縦軸は、生理食塩液を投与したコントロールの腫瘍重量との比率（T/C）、横軸はrIL-2の投与量（ $\times 10^4$ JRU/マウス）を示す。

【図6】 rIL-2を含む本発明製剤及び対照としてrIL-2を含まないクロット製剤を、ヒト肝細胞癌細胞（HuH-7）を背部皮下に移植したヌードマウスの腫瘍近傍に、10日間連続（移植7日目から16日目まで）投与した場合の相対腫瘍重量比を調べた結果を示すグラフである。縦軸は、生理食塩液を投与したコントロールの腫瘍重量との比率（T/C）、横軸は細胞移植後の日数（日）を示す。

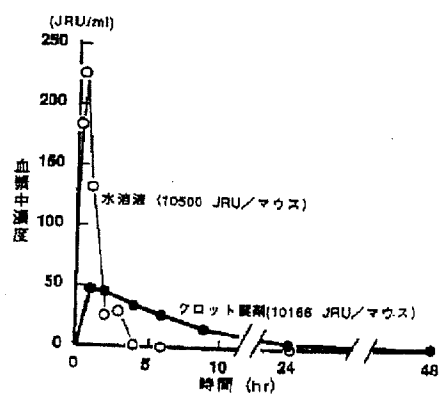
30 【0038】

【図7】 本発明製剤の対照製剤としてrIL-2を含む水溶液を、ヒト肝細胞癌細胞（HuH-7）を背部皮下に移植したヌードマウスの腫瘍近傍に、10日間連続（移植7日目から16日目まで）投与した場合の相対腫瘍重量比を調べた結果を示すグラフである。縦軸は、生理食塩液を投与したコントロールの腫瘍重量との比率（T/C）、横軸は細胞移植後の日数（日）を示す。

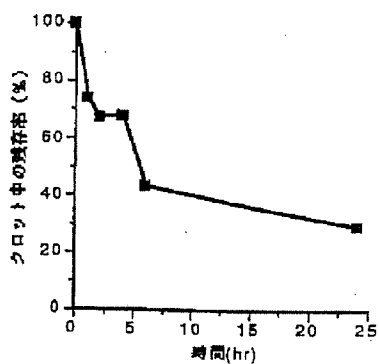
【図1】



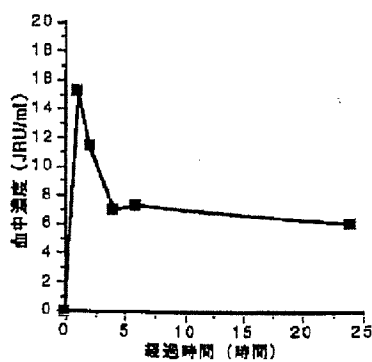
【図2】



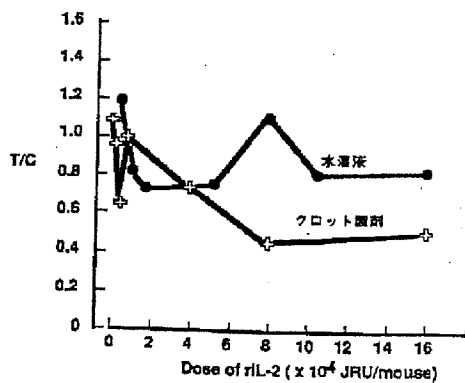
【図3】



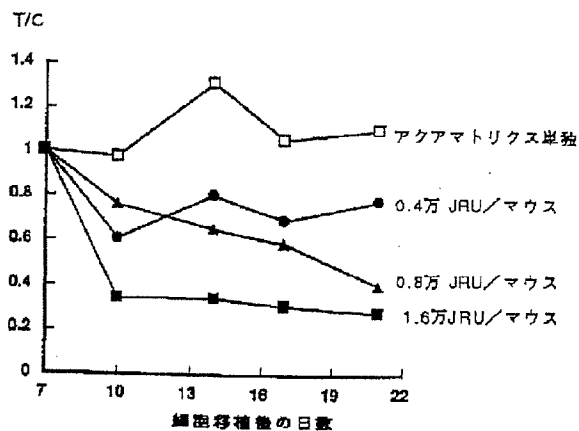
【図4】



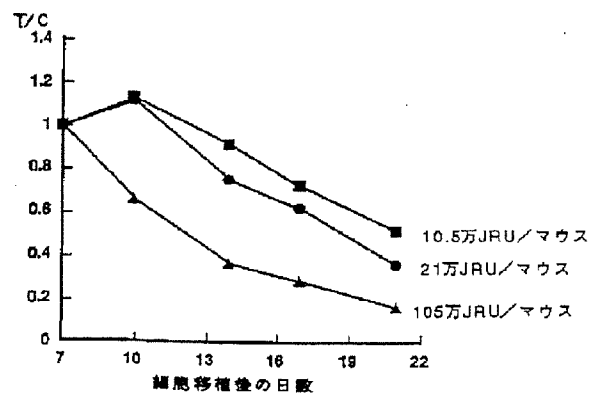
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
A 61 K 47/42

識別記号 庁内整理番号

F I
A 61 K 37/66

技術表示箇所
H